



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁵ : A23C 9/14, 9/146, B01D 15/08 C12N 5/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/00014 (43) Date de publication internationale: 9 janvier 1992 (09.01.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00502			(74) Mandataire: CABINET BEAU DE LOMENIE; 37, rue du Vieux-Faubourg, F-59800 Lille (FR).
(22) Date de dépôt international:	24 juin 1991 (24.06.91)		
(30) Données relatives à la priorité: 90/08573	28 juin 1990 (28.06.90)	FR	(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CLAR (SARL) [FR/FR]; Domaine de Radinghem, Radinghem, F-62310 Fruges (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): QUINQUE, Bernard [FR/FR]; 2015, route Nationale, F-62140 Marconnelle (FR). LESUR, Hélène [FR/FR]; 8, rue Bodelot, F-62460 Divion (FR). SPIK, Geneviève [FR/FR]; 39, résidence du Moulin, Rue de la Pilaterie, F-59700 Marcq-en-Barœul (FR). MONTREUIL, Jean [FR/FR]; 145, rue Boucley, F-59650 Villeneuve-d'Ascq (FR). THOMAS, Daniel [FR/FR]; 33, allée de l'Etang, Domaine de Rimderieu, F-60150 Villers-sur-Coudun (FR).			Publiée Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: METHOD FOR TREATING COLOSTRUM BY HYDROXYAPATITE ADSORPTION CHROMATOGRAPHY, AN ACTIVE FRACTION OF COLOSTRUM THEREBY OBTAINED, AND A CELLULAR MEDIUM CONTAINING SAME

(54) Titre: PROCEDE DE TRAITEMENT DU COLOSTRUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR HYDROXYAPATITE, FRACTION ACTIVE DE COLOSTRUM OBTENUE ET MILIEU CELLULAIRE CONTENANT LADITE FRACTION ACTIVE

(57) Abstract

According to the method, the preferably skimmed colostrum is contacted with a cation exchanger such as a sulphonate-function resin, the portion separated from the exchanger by elution is subjected to hydroxyapatite adsorption, and the fraction retained on the hydroxyapatite is recovered by elution, by washing with a phosphate pad at a maximum concentration of 500 mM, preferably about 100 mM. The retained, active fraction contains more than half of the growth factors of the initial colostrum, but almost no proteases, and can be used as an additive for cell culture media, particularly as a substitute for foetal calf serum.

(57) Abrégé

Le procédé de traitement du colostrum consiste à mettre en contact le colostrum, de préférence écrémé, avec un échangeur de cations, par exemple une résine à fonctions sulfoniques, à soumettre la partie déplacée de l'échangeur par élution à une chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite et à récupérer par élution la fraction retenue sur l'hydroxyapatite, par lavage par un tampon phosphate à une concentration au plus de 500 mM, de préférence 100 mM environ. La fraction retenue, dite fraction active, contient plus de la moitié des facteurs de croissance du colostrum initial et est pratiquement dépourvue de protéases. Elle est utilisée comme additif dans des milieux de culture cellulaire, notamment comme substitut du serum de veau fœtal.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

1

PROCEDE DE TRAITEMENT DU COLOSTRUM PAR CHROMATOGRAPHIE
D'ADSORPTION SUR HYDROXYAPATITE , FRACTION ACTIVE DE COLOSTRUM
OBTENUE ET MILIEU CELLULAIRE CONTENANT LADITE FRACTION ACTIVE

DOMAINE TECHNIQUE

05 La présente invention concerne le traitement du colostrum , notamment en vue d'obtenir une fraction de colostrum particulièrement riche en facteurs de croissance et dépourvue de protéases. Elle concerne le procédé de traitement proprement dit ainsi que la fraction de colostrum spécialement obtenue au cours
10 du traitement. Elle concerne également l'utilisation dans des milieux de culture d'une fraction de colostrum riche en facteurs de croissance et pauvre en protéases, dénommée fraction active

TECHNIQUE ANTERIEURE

15 Dans le domaine de la culture cellulaire, le sérum est l'additif le plus utilisé pour stimuler la prolifération cellulaire. Ce liquide biologique renferme les facteurs nécessaires à la nutrition, à la croissance et au développement des cellules de l'organisme. Son action est imparfaitement connue et sa composition très variable d'un lot à l'autre. De plus c'est
20 un produit soumis à des fluctuations d'approvisionnement et coûteux. On recherche donc des substituts du sérum, aptes au développement de milieux de culture cellulaire parfaitement définis

On a proposé de remplacer le sérum par des produits
25 laitiers, tels que des fractions de lait ou de lactosérum de vache, par exemple dans le document FR.A.2.586 699 des fractions de lait formées de constituants ayant un poids moléculaire d'au moins environ 27.000 et dépourvues de lipides insolubles du type de ceux éliminables par ultracentrifugation. De telles fractions
30 sont obtenues en soumettant une phase limpide de lait renfermant les protéines solubles du lait, obtenue par ultracentrifugation et séparation, à une ultrafiltration avec une membrane à seuil de coupure de 50 à 27.000 daltons environ.

Parmi les produits laitiers, on a proposé de remplacer le

sérum par le colostrum, qui est le liquide sécrété par la glande mammaire dans les quelques jours qui suivent une naissance. Dans le document US.A.4,440,860 il est décrit une fraction du colostrum comme facteur de croissance particulièrement actif, 05 cette fraction a un poids moléculaire inférieur à 20.000 et un point isoélectrique compris entre 4,4 et 4,8. Cette fraction est obtenue par un écrémage , suivi d'une mise en contact du colostrum écrémé avec de l'acide acétique pH 4,3 pendant 2 heures et centrifugation pour éliminer le précipité, puis par 10 purification basée sur le point isoélectrique , filtration sur un gel et éventuellement concentration par électrophorèse.

Les procédés précités concernent une sélection de composants basée sur le poids moléculaire.

D'autres procédés visent à isoler le facteur de croissance principal du colostrum. De tels procédés sont décrits par Yuen Shing et Michael Klagsbrum dans l'article intitulé "Purification and Characterization of a Bovine Colostrum-Derived Growth Factor" paru dans Molecular Endocrinology 87/0335 et par Yuen Shing , Susan Davidson et Michael Klagsbrum dans l'article intitulé 20 "Purification of Polypeptide Growth Factors from Milk" paru dans Methods in Enzymology - 1987 - volume 146 - pages 42-48 .Selon ces auteurs , le facteur de croissance principal est le BCGF (Bovine Colostrum Growth Factor) dans le cas du colostrum de vache, ayant un poids moléculaire d'environ 30.000, et le PDGF 25 (human platelet-derived growth factor) dans le cas du colostrum humain, ayant un poids moléculaire d'environ 20.000. Pour isoler le facteur de croissance principal du colostrum bovin, les procédés en question comportent une succession d'opérations : écrémage, précipitation par voie acide et par ébullition, 30 chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'isoélectrofocalisation ou bien écrémage, filtration, chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'isoélectrofocalisation , cette opération étant suivie dans les deux cas par une séparation du type HPLC reverse phase . Dans ces 35 procédés le rendement obtenu en facteurs de croissance est de

l'ordre de 1%, c'est-à-dire qu'au cours des différentes opérations mises en oeuvre, 99% de l'activité en facteurs de croissances du colostrum initial ont été perdus.

EXPOSE DE L'INVENTION

05 Le but que s'est fixé le demandeur est différent de ceux poursuivis par les procédés précités. Il cherche dans un premier temps à obtenir une fraction du colostrum, qui soit enrichie en facteurs de croissance, mais sans qu'il y ait une particulière purification du facteur de croissance principal, et qui de plus 10 soit pauvre en protéases.

Le demandeur a, en effet, constaté que la présence des protéases, qui sont des enzymes hydrolysant les protides, empêchait une bonne conservation dans le temps des fractions de colostrum enrichies en facteurs de croissance et de plus 15 entraînait une baisse progressive de l'activité desdites fractions.

Le but visé est parfaitement atteint par le procédé de l'invention. Ce procédé de traitement du colostrum comprend de manière connue au moins une opération de chromatographie d'échange 20 de cations. Selon l'invention, on soumet la partie du colostrum qui a été déplacée par élution de l'échangeur de cations à une chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite et on récupère par élution la fraction retenue sur l'hydroxyapatite.

On sait que l'hydroxyapatite est un phosphate tricalcique 25 cristallisé et qu'il est utilisé comme support d'adsorption pour le fractionnement des protéines.

C'est le mérite de l'invention que d'avoir expérimenté et vérifié que l'utilisation de l'hydroxyapatite permettait non seulement de parfaire l'enrichissement en facteurs de croissance 30 mais aussi d'éliminer les protéases de la fraction ainsi enrichie.

Plus particulièrement on récupère la fraction retenue sur l'hydroxyapatite par lavage par un tampon phosphate à une concentration au plus de 500mM.

Par exemple, on procède à un premier lavage de 35 l'hydroxyapatite par un tampon phosphate pH 6,8 environ à une

concentration au plus de 50mM puis à un second lavage par un tampon phosphate pH 6,8 environ à une concentration de l'ordre de 100mM. C'est ce second lavage qui constitue la fraction du colostrum enrichie en facteurs de croissance et pauvre en protéases. De préférence cette fraction est dessalée, concentrée et congelée ou séchée par exemple par lyophilisation ou par atomisation.

Avantageusement, l'échangeur de cation étant à fonctions sulfoniques, on obtient la partie du colostrum déplacée dudit échangeur, après un premier lavage de l'échangeur avec une solution au plus 0,1M d'acétate de sodium, par lavage de l'échangeur par une solution environ 0,5M d'acétate de sodium.

Avantageusement on ne procéde, préalablement à la chromatographie d'échange de cations, qu'à une seule opération qui est un écrémage portant la teneur en matière grasse du colostrum à 2g/l au plus.

Selon le mode préféré de réalisation du procédé de l'invention, on procède sur le colostrum aux opérations successives suivantes :

- 20 a. écrémage, portant la teneur en matière grasse à 2g/l au plus
- b. passage du colostrum écrémé sur un échangeur à fonctions sulfoniques
- c. premier lavage de l'échangeur avec une solution au plus 0,1M d'acétate de sodium
- 25 d. second lavage de l'échangeur avec une solution d'acétate de sodium 0,5M environ
- e. passage de la partie correspondant au second lavage (d), dessalée et concentrée, sur de l'hydroxyapatite équilibrée à 10mM environ
- f. premier lavage de l'hydroxyapatite par un tampon phosphate pH6,8 environ à 50mM au plus
- 30 g. second lavage de l'hydroxyapatite par un tampon phosphate pH6,8 environ à 100mM environ
- h. dessalage, concentration et congélation ouséchage de la partie correspondant au second lavage (g)

La fraction de colostrum ainsi obtenue , dite fraction active, comporte plus de 50% de l'ensemble des facteurs de croissance du colostrum initial et est pratiquement exempte de protéases.

05 C'est un autre objet de l'invention que de protéger des milieux de culture cellulaire comportant de la fraction active comme additif pour stimuler la prolifération cellulaire. Les types cellulaires concernés sont des cellules d'eucaryotes, entre autres fibroblastes, hybridomes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, hépatocytes, lymphocytes, macrophages, 10 adipocytes, cellules hématopoïétiques, cellules granulo-monocytaires, cellules cardiaques, cellules nerveuses, cellules musculaires, cellules cutanées, kératinocytes, mélanocytes, chondrocytes, cellules d'insecte.

15 Un milieu de culture cellulaire particulièrement intéressant comporte du sérum de veau foetal et de la fraction active. L'action combinée de la fraction active et du sérum permet de diminuer de façon très importante la quantité de sérum mise en oeuvre pour une croissance cellulaire équivalente. La fraction 20 active peut trouver son utilité dans d'autres secteurs, notamment pharmaceutique ou cosmétologique.

MEILLEURE MANIERE DE REALISER L'INVENTION

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention ressortiront plus clairement de la description qui va être faite 25 d'un exemple de traitement du colostrum sur hydroxyapatite.

Le terme colostrum désigne le mélange de sécrétions lactées et de constituants du sérum sanguin, obtenu dans les 7 jours suivant la mise-bas (post-partum) . Il provient de la vache ou d'autres mammifères.

30 On part d'un colostrum de vache , auquel on fait subir un écrémage par centrifugation à 7900 tours par minute de manière à éliminer la plupart des matières grasses . Sans autre traitement préalable, un litre de colostrum écrémé , ayant une teneur en matières grasses inférieure à 2g/l, est mis en contact avec 15g 35 d'une résine échangeuse de cations, à fonctions sulfoniques,

commercialisée par la société PHARMACIA sous la référence SP-SEPHADEX C-50. Le pH est de 6,3 . La mise en contact a lieu sous agitation pendant une durée d'au moins 4 heures et à 4°C.

La partie du colostrum écrémé restant dans le bain contient
05 tous les composants qui n'ont pas été retenus par les fonctions sulfoniques de la résine. Cette partie du colostrum est pratiquement exempte de facteurs de croissance ; cependant elle présente un intérêt du fait qu'elle est riche entre autres composants en immunoglobulines colostrales , en sucres, en enzymes
10 et en protéose-peptones. Elle pourra être utilisée telle quelle ou après séparation desdits composants.

Après élimination du bain, la résine est d'abord lavée à l'aide d'une solution 0,1 molaire d'acétate de sodium. Ce premier lavage a pour but d'enlever de la surface de la résine les
15 composants qui ne sont pas à proprement parler retenus par échange ionique sur les fonctions sulfoniques.

On procède ensuite à un deuxième lavage de la résine à l'aide d'une solution 0,5 molaire d'acétate de sodium. Ce lavage a pour effet de déplacer une partie des composants du colostrum qui
20 étaient retenus par échange ionique sur les fonctions sulfoniques de la résine. Ce déplacement est fonction de différents paramètres tels l'affinité respective des composants pour les fonctions sulfoniques , la cinétique d'échange , l'effet stérique.

On procède enfin à un troisième lavage de la résine à
25 l'aide d'une solution 1,0 molaire d'acétate de sodium.

Les deux solutions de lavage à 0,5 et 1,0M d'acétate de sodium sont respectivement dessalées par ultrafiltration, dialyse, électrodialyse, ou tamisage moléculaire , puis concentrées par ultrafiltration avec un seuil de coupure de 5.000
30 de masse moléculaire.

Une analyse comparative du colostrum écrémé initial, et des deux fractions correspondant l'une au lavage 0,5M et l'autre au lavage 1,0M fait apparaître d'une part que plus de 80 % des facteurs de croissance contenus dans le colostrum écrémé se
35 trouvent dans les deux fractions, et d'autre part que la fraction

correspondant au lavage 0,5M, contient 73,2% des facteurs de croissance contenus dans le colostrum écrémé. Cette fraction contient également entre autres composants de la lactoperoxydase, de la lactotransferrine , du lysozyme et des protéases.

05 Le tableau I ci-dessous donne les résultats comparés entre le colostrum écrémé (A) et la fraction élue à 0,5M.

Tableau I

10	:	(A)	:	(B)	:
	:	: colostrum écrémé	:	:fraction élue à 0,5M:	
	-----	-----	-----	-----	-----
	:protéines totales	: 130.000	:	1.620	:
	: (mg)	:	:	:	:
15	:activité totale	: 130.000	:	95.256	:
	: (U)	:	:	:	:
	:activité spécifique	: 1	:	58,8	:
	: (U/mg)	:	:	:	:
	:rendement d'activité	: 100	:	73,2	:
20	: (%)	:	:	:	:
	-----	-----	-----	-----	-----

La teneur en protéines a été dosée par la technique LOWRY, modifiée par PETERSON. L'unité U de facteur de croissance, encore 25 appelée activité mitogène, est égale à la quantité de protéines nécessaires pour provoquer une incorporation de méthyl-thymidine tritiée égale à la moitié de l'incorporation maximale.

Cette fraction (B) est dessalée et concentrée, puis injectée sur une colonne d'hydroxyapatite préalablement équilibrée 30 dans un tampon phosphate pH6,8 à 10mM. La quantité d'hydroxyapatite , qui a la forme d'un gel, est déterminée en fonction de la quantité de protéines présentes dans la fraction, de façon à ce qu'il y ait au plus 40mg de protéines par millilitre de gel d'hydroxyapatite.

35 On élue ensuite la colonne d'hydroxyapatite successivement

par trois solutions tampons phosphates pH 6,8 à des concentrations de plus en plus concentrées , respectivement 50mM pour le premier, 100mM pour le deuxième et 500mM pour le troisième.

Chacune des fractions obtenues est dessalée , concentrée et
05 lyophilisée. Les fractions 50 et 500mM renferment quasiment la totalité des protéases. Seule la fraction 100mM est quasiment exempte de protéases.

La deuxième fraction, correspondant à l'élution par la solution à 100mM , dite fraction active, est la seule enrichie
10 en facteurs de croissance.

Dans le tableau II ci-dessous , on a complété les résultats donnés dans le tableau I à l'aide des informations relatives à ladite fraction active (C).

Tableau II

15	-----	(A)	(B)	(C)	:
	: colostrum écrémé:	échange d'ions:	hydroxyapatite :		
	: :		: élution à 0,5M :	élution à 0,1M :	
	-----	-----	-----	-----	-----
20	: Protéines	: 130.000 mg	: 1.620 mg	: 648 mg	:
	: totales	: .	: .	: .	:
	: Activité	: 130.000 U	: 95.256 U	: 76.205 U	:
	: totale	: .	: .	: .	:
	: Activité	: 1 U/mg	: 58,8U/mg	: 117,6 U/mg	:
25	: spécifique	: .	: .	: .	:
	: Rendement	: 100 %	: 73,2 %	: 59 %	:
	-----	-----	-----	-----	-----

Par rapport au colostrum écrémé (A), la fraction active (C) se distingue par une très forte activité spécifique.

30 Une comparaison a été faite entre la fraction active et le sérum de veau foetal qui est l'additif le plus répandu pour stimuler la prolifération cellulaire. Pour cela on a utilisé un test d'incorporation de thymidine tritiée pour détecter les activités mitogènes respectives sur la souche de fibroblastes
35 CCL39. Il ressort de cette comparaison que l'activité spécifique

de la fraction active (117,6U/mg de protéines) est nettement plus importante que celle du sérum de veau foetal (15 U/mg de protéines). Ceci est un réel avantage pour la fraction active dans la mesure où il est souvent nécessaire d'éliminer 05 ultérieurement du milieu de culture les protéines qui ont été introduites avec l'additif ; dans le cas de la fraction active la quantité de protéines à éliminer est faible.

La fraction active est utile en remplacement ou en combinaison avec le sérum de veau foetal, dans les milieux de 10 culture cellulaire, par exemple dans un milieu MEM (Milieu Essentiel Minimum de Eagle) additionné de 2,2g/l de bicarbonate de soude, de 1% en volume de glutamine, 0,4 % en volume de pénicilline, de 0,4% de streptomycine, de 0,5% en volume de fungizone.

15 La fraction active a été utilisée comme additif de croissance dans un milieu de culture pour des fibroblastes CCL 39 en complément du sérum de veau foetal. Les plaques de culture, préalablement traitées ou non à la fibronectine, ont été ensemencées à raison de 160 000 cellules et 2 ml de milieu par 20 puits, ledit milieu comprenant une certaine quantité de fraction active.

Par exemple l'addition de 1 % en volume de sérum de veau foetal et de 1 % en volume de la fraction active (contenant 1 g/l de protéines) dans un milieu de culture de fibroblastes permet 25 d'obtenir une croissance cellulaire correspondant à celle obtenue avec environ 9 % en volume de sérum de veau foetal dans le même milieu.

L'invention n'est pas limitée au mode de réalisation qui a été décrit à titre d'exemple non exhaustif, mais en couvre 30 toutes les variantes. En particulier les conditions du traitement revendiquées ne sont pas limitées à ce qui a été décrit, d'autres types d'échangeurs de cations, autres que la résine, peuvent être mis en oeuvre, de même que des échangeurs ayant une autre fonction que la fonction sulfonique ; le déplacement de la partie 35 du colostrum retenue sur l'échangeur de cation peut être obtenu par toute voie habituelle de régénération dudit échangeur, et le fonctionnement approprié sera déterminé au cas par cas.

REVENDICATIONS

1. Procédé de traitement du colostrum comprenant au moins une opération de chromatographie d'échange de cations caractérisé en ce qu'on soumet la partie du colostrum , qui a été déplacée par élution de l'échangeur de cations, à une chromatographie 05 d'adsorption sur hydroxyapatite et on récupère par élution la fraction retenue sur l'hydroxyapatite.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'on récupère la fraction retenue sur l'hydroxyapatite par lavage par un tampon phosphate à une concentration au plus de 500mM.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'on procède à un premier lavage de l'hydroxyapatite par un tampon phosphate à une concentration au plus de 50mM puis à un second lavage par un tampon phosphate à une concentration de l'ordre de 100mM , la partie récupérée de ce second lavage correspondant à la 15 fraction active enrichie en facteurs de croissance et pauvre en protéases.
4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que la fraction active est dessalée, concentrée et congelée ou séchée.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce 20 que , l'échangeur de cations étant à fonctions sulfoniques, on obtient la partie du colostrum déplacée dudit échangeur, après un premier lavage de l'échangeur avec une solution au plus 0,1M d'acétate de sodium, par lavage de l'échangeur par une solution de l'ordre de 0,5M d'acétate de sodium.
- 25 6. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que , préalablement à la chromatographie d'échange de cations, on ne procède sur le colostrum qu'à une seule opération qui est un écrémage , portant la teneur en matière grasse du colostrum à 2g/l au plus.
- 30 7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que on a procédé sur le colostrum aux opérations successives suivantes :
 - a. écrémage, portant la teneur en matière grasse à 2g/l au plus
 - b. passage du colostrum écrémé sur un échangeur à fonctions

sulfoniques

- c. premier lavage de l'échangeur avec une solution salée au plus 0,1M d'acétate de sodium
- d. second lavage de l'échangeur avec une solution d'acétate de sodium 0,5M environ
- 05 e. passage de la partie correspondant au second lavage (d) dessalée et concentrée, sur de l'hydroxyapatite équilibrée à environ 10mM en tampon phosphate
- 10 f. premier lavage de l'hydroxyapatite par un tampon phosphate pH de l'ordre de 6,8 à 50mM au plus
- g. second lavage de l'hydroxyapatite par un tampon phosphate pH de l'ordre de 6,8 à environ 100mM
- 15 h. dessalage, concentration et congélation ou séchage de la partie résultant du second lavage (g) et correspondant à la fraction active

8. Fraction active de colostrum obtenue par le procédé de l'une des revendications 3 ou 7 caractérisée en ce qu'elle comporte plus de 50% des facteurs de croissance du colostrum initial et qu'elle est pratiquement exempte de protéases.

20 9. Milieu de culture cellulaire caractérisé en ce qu'il comporte de la fraction active selon la revendication 8 comme additif pour stimuler la prolifération cellulaire.

10. Milieu selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il concerne la culture de cellules d'eucaryotes, notamment

25 fibroblastes, hybridomes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, hépatocytes, lymphocytes, macrophages, adipocytes, cellules hématopoïétiques, cellules granulo-monocytaires, cellules cardiaques, cellules nerveuses, cellules musculaires, cellules cutanées, kératinocytes, mélanocytes, chondrocytes, cellules

30 d'insecte.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00502

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. 5 A 23 C 9/14 A 23 C 9/146 B 01 D 15/08 C 12 N 5/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. 5	A 23 C 9/00 B 01 D 15/00 C 12 N 5/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP-A-0085005 (FROMAGERIES BEL) 03 August 1983, see claims 1-8 ---	1
A	FR-A-2487642 (FROMAGERIES BEL) 05 February 1982, see claims 1-10 ---	1
A	US-A-4440860 (M. KLAGSBRUN) 03 April 1984, see abstract; claims 1-33 ---	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Vol. 4, No. 30 (C-2) [512], 15 March 1980, & JP-A-55 3721 (MORINAGA NIYUUGIYOU K.K.) 11 January 1980 -----	1

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search
19 August 1991 (19.08.91)

Date of Mailing of this International Search Report
19 September 1991 (19-09-91)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9100502
SA 48787

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/09/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0085005	03-08-83	FR-A-	2520235	29-07-83
		CA-A-	1196310	05-11-85
		US-A-	4582580	15-04-86
FR-A- 2487642	05-02-82	None		
US-A- 4440860	03-04-84	None		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 91/00502

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB
 Int.C1.5 A 23 C 9/14 A 23 C 9/146 B 01 D 15/08
 C 12 N 5/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification			
Int.C1.5	A 23 C 9/00	B 01 D 15/00	C 12 N 5/00	

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	EP-A-0 085 005 (FROMAGERIES BEL) 3 août 1983, voir revendications 1-8 ---	1
A	FR-A-2 487 642 (FROMAGERIES BEL) 5 février 1982, voir revendications 1-10 ---	1
A	US-A-4 440 860 (M. KLAGSBRUN) 3 avril 1984, voir abrégé; revendications 1-33 ---	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 4, no. 30 (C-2)[512], 15 mars 1980, & JP-A-55 3721 (MORINAGA NIYUUGIYOU K.K.) 11 janvier 1980 -----	1

o Catégories spéciales de documents cités¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19-08-1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19. 09. 91

Administration chargée de la recherche internationale
 OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

Danielle van der Haas

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9100502
SA 48787

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11/09/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0085005	03-08-83	FR-A- 2520235 CA-A- 1196310 US-A- 4582580	29-07-83 05-11-85 15-04-86
FR-A- 2487642	05-02-82	Aucun	
US-A- 4440860	03-04-84	Aucun	

